

## UGT1A1 基因多态性与昆明地区重症新生儿黄疸的遗传关联性研究

刘玲<sup>1)</sup>, 芮丹云<sup>2)</sup>, 蒋榆辉<sup>1)</sup>, 李杨方<sup>1)</sup>, 张路<sup>1)</sup>, 和灿琳<sup>1)</sup>, 杨仁华<sup>3)</sup>, 胡敏<sup>2)</sup>

(1) 昆明市儿童医院新生儿科, 云南昆明 650031; 2) 昆明学院昆明分子医学研究中心, 云南昆明 650214; 3) 昆明医科大学实验动物学部, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探讨尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UGT1A1) 基因编码序列 (Gly71Arg) 的突变及启动序列 (非编码序列即 TATA) 核苷酸的多态性与昆明地区重症新生儿黄疸的遗传关联性研究. **方法** 187 例重症新生儿黄疸作为病例组, 65 例无黄疸新生儿作为对照组. 采用常规方法提取 DNA, 用聚合酶链反应 (PCR) 方法扩增 UGT1A1 第 1 外显子, 琼脂糖凝胶电泳鉴定产物, PCR 产物进行 DNA 测序. **结果** 病例组与对照组 Gly71Arg 等位基因突变率分别为 32% 及 15%, 病例组 Gly71Arg 基因频率显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 11.366$ ,  $P = 0.001$ ,  $P < 0.05$ ); 病例组与对照组 TATA 等位基因突变率分别为 9% 及 7%, 等位基因频率在病例组及对照组间无统计学差异 ( $\chi^2 = 2.336$ ,  $P = 0.126$ ,  $P > 0.05$ ). **结论** 昆明地区重症新生儿黄疸的发生与 Gly71Arg 突变密切相关, 而与 TATA 的多态性无关.

**[关键词]** 新生儿; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶; 基因突变; 黄疸

**[中图分类号]** R722.17 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 12 - 0052 - 04

## The Heredity Relevance of UGT1A1 Gene Mutation to the Severe Neonatal Jaundice in Kunming

LIU Ling<sup>1)</sup>, RUI Dan - yun<sup>2)</sup>, JIANG Yu - hui<sup>1)</sup>, LI Yang - fang<sup>1)</sup>, ZHANG Lu<sup>1)</sup>, HE Can - lin<sup>1)</sup>,  
YANG Ren - hua<sup>3)</sup>, HU Min<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Newborn, Kunming Children Hospital, Kunming Yunnan 650031; 2) Research Center for Medicine of Kunming University, Kunming Yunnan 650214; 3) Department of Laboratory Animal of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the heredity relevance of UGT1A1 gene mutation in exon (Gly71Arg) and priming (TATA) to the neonatal severe jaundice in Kunming. **Methods** 187 severe jaundice neonates were selected into the case group, and 65 neonates without jaundice were selected into the control group. The DNA of blood samples was extracted, and PCR was used for amplification of the first exon of UGT1A1, and the PCR products were identified by agarose gel electrophoresis and DNA sequencing. **Results** The allele gene frequency of G71R in the case group and the control group was 32% and 15%, respectively, the allele gene frequency of G71R in the case group was significantly higher than the control group, the difference had statistical significance ( $\chi^2 = 11.366$ ,  $P = 0.001$ ,  $P < 0.05$ ). The allele gene frequency of TATA in the case group and the control group was 9% and 7%, respectively, and there was no statistical difference between two groups ( $\chi^2 = 2.336$ ,  $P = 0.126$ ,  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Severe neonatal jaundice is closely correlated with Gly71Arg mutation, and independent of TATA mutation in Kunming.

**[Key words]** Neonatus; UGT 1A1 gene; Gene mutation; Jaundice

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2010ZC169)

**[作者简介]** 刘玲 (1971~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事新生儿临床工作. 芮丹云和刘玲对本文有同等贡献.

**[通讯作者]** 蒋榆辉. E-mail:943028789@qq.com; 杨仁华. E-mail:yangrhua@msn.com

重症新生儿黄疸是指病因不明、临床常规治疗效果不理想、黄疸持续时间长, 总胆红素值 > 342  $\mu\text{mol/L}$  的一类新生儿黄疸<sup>[1]</sup>, 此类黄疸易造成胆红素脑病或多器官功能损害, 部分患儿可留下严重的神经系统后遗症。尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase 1A1, UGT1A1) 是人体内唯一催化胆红素结合反应的酶, 其特异性底物为胆红素, 在胆红素代谢中起重要作用。该基因在启动子及编码区的不同多态性改变, 可引起其表达减低或酶的活性降低, 与部分新生儿重症黄疸的高发生率密切相关。本研究旨在探讨 UGT1A1 基因编码区 Gly71Arg 突变和启动子 TATA 突变与昆明地区重症新生儿黄疸的遗传关联性。现报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

病例组为昆明市儿童医院 2010 年 3 月至 2011 年 3 月收治的重症新生儿黄疸 187 例, 日龄为 7~28 d, 男 101 例, 女 86 例, 胎龄均  $\geq 37$  周, 平均胎龄 ( $274.49 \pm 7.59$ ) d, 出生体重 ( $3.05 \pm 0.56$ ) kg, 总胆红素 ( $391.64 \pm 109.52$ )  $\mu\text{mol/L}$ , 间接胆红素 ( $359.1 \pm 108.9$ )  $\mu\text{mol/L}$ 。排除新生儿溶血症、感染、颅内出血、头颅血肿、母乳性黄疸、甲状腺功能低下、红细胞增多症、窒息、缺氧、低出生体重及其他围产因素等病因, 入院后经蓝光照射、药物治疗等干预后黄疸消退欠佳, 符合重症新生儿黄疸诊断<sup>[1]</sup>。对照组: 为同期住院的无黄疸患儿 65 例。胎龄均  $\geq 37$  周, 平均胎龄 ( $277.9 \pm 7.52$ ) d, 男 37 例, 女 28 例, 出生体重 ( $3.24 \pm 0.60$ ) kg, 日龄为 7~28 d 的新生儿。与病例组在男女比例、胎龄、出生体重、日龄、开奶时间、红细胞压积等比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 具有可比性。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 提取** 取静脉血 2 mL, EDTA 抗凝, 加 3% 明胶生理盐水分离白细胞。酚-氯仿抽提, 无水乙醇沉淀 DNA。加 75% 乙醇保存备用, 做 PCR 前用 TE 缓冲液充分溶解 DNA。

**1.2.2 引物设计** 根据 UGT1A1 基因第 1 外显子序列和侧翼结构<sup>[2,3]</sup>参考文献<sup>[4]</sup>设计引物。检测 Gly71Arg 基因型 PCR 引物: 上游引物 5' CACCTGACGCCTCGTTGTA 3'; 下游引物 5' GAACAGCCAGACAAAAGCATAG 3'; TATA 盒基

因型检测: SSCP。反应体系:  $10 \times \text{PCR}$  缓冲液 ( $15 \text{ mmol/L MgCl}_2$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $4 \times \text{NTP}$  ( $10 \text{ mmol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 ( $10 \mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , 上游引物: 5' AGCCAGTTCAACTGTTGTGTC 3'; 下游引物: 5' CTAGGACAACCTATTTTCATGTCC 3', 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA 聚合酶 1  $\mu\text{L}$ , 去离子水 19  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.3 PCR 产物提取** 反应体系总体积 50  $\mu\text{L}$ , 预变性  $95^\circ\text{C}$ , 12 min, 变性  $94^\circ\text{C}$ , 1 min, 退火  $64^\circ\text{C}$ , 1 min, 延伸  $72^\circ\text{C}$ , 1 min。循环 35 次。PCR 产物经 2% Agarose 电泳检测, 溴乙啶染色, 紫外灯观察, 鉴定 PCR 产物。PCR 产物为包含 UGT1A1 基因第 1 外显子在内的 935 bp 片段, 呈单一区带, 用 100 bp DNA Ladder 作 Marker 测定 PCR 产物大小。

1% 琼脂糖电泳, 150 V、100 mA 20 min 电泳观察(见图 1)。

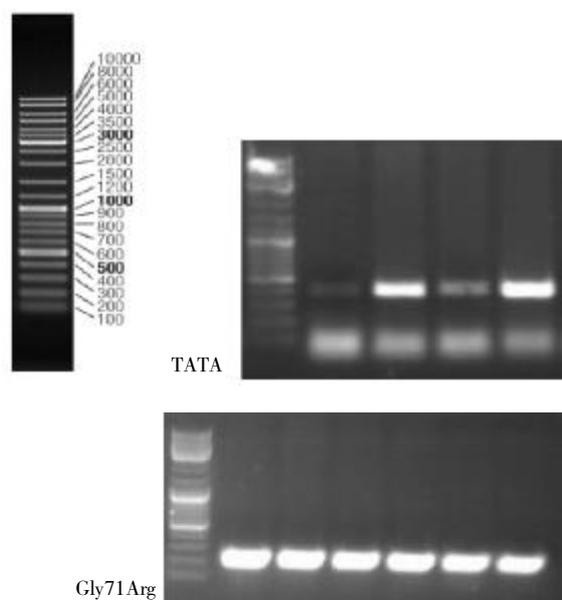


图 1 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis image

**1.2.4 PCR 产物测序** 进行 PCR 产物直接测序以验证结果。

### 1.3 统计学处理

PCR 用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UGT1A1 Gly71Arg 基因型分布及等位基因突变率分析

2 组 252 例新生儿中 G71R 突变杂合子 (Arg/Gly) 89 例, 突变纯合子 (Arg/Arg) 26 例. 病例组 G71R 基因突变频率 0.32 高于对照组 0.15, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1.

## 2.2 UGT1A1 TATA 基因型分布及等位基因突变

## 频率

2 组婴儿中发现 UGT1A1 TATA 突变纯合子 A (TA) 7TAA (7/7) 2 例. 等位基因突变频率在病例组为 9%, 对照组为 7%, 差异无统计学意义 (注:  $\chi^2 = 2.336$ ,  $P = 0.126$ ,  $P > 0.05$ ), 见表 2.

表 1 两组 UGT1A1 G71R 基因型分布及等位基因突变频率比较 [n(%)]

Tab. 1 Comparison of the allele gene frequency of G71R between two groups [n(%)]

组别	n	UGT1A1 基因型			等位基因突变频率
		纯合子	杂合子	野生型	
病例组	187	24(13)	73(39)	90(48)	121(32)
对照组	65	2(3)	16(25)	47(72)	20(15)

表 2 两组 UGT1A1 TATA 基因型分布及等位基因频率比较 [n (%)]

Tab. 2 Comparison of the allele gene frequency of TATA between two groups [n (%)]

组别	n	UGT1A1 基因型			等位基因突变频率
		纯合子	杂合子	野生型	
病例组	187	2(1)	30(16)	155(83)	34(9)
对照组	65	0(0)	9(14)	80(86)	9(7)

## 3 讨论

新生儿黄疸是新生儿期常见的疾病, 也是全球儿科医生共同关注的热点问题. 目前常规的诊疗方法对新生儿重症黄疸 (总胆红素值常大于  $342 \mu\text{mol/L}$ ) 的诊治已不能获得满意的疗效, 部分重症患儿常死于急性期, 幸存者有 75%~90% 可能并发严重神经系统后遗症, 对患儿健康和生存质量造成了重大威胁. 近年有资料显示尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶 (UGT) 基因的多态性可能是导致新生儿重症黄疸的常见的遗传高危因素之一. UGT 存在于大部分脊椎动物的肝微粒体中, 属于糖基转移酶超家族, 是生物体内进行第 II 相生物转化时最重要的酶之一. 其中 UGT1A1 基因主要分布于肝脏, 是肝脏中唯一具有胆红素葡萄糖醛酸化反应活性的酶, 也是调节胆红素清除的关键酶. 该基因编码序列的突变可导致 UGT 结构异常, 出现酶结合功能的缺陷或丧失<sup>[5]</sup>, 而启动序列 (非编码序列) 核苷酸的多态性则导致表达能力下降引起酶活性降低, 从而使非结合胆红素在体内蓄积, 是新生儿黄疸发生发展的高危因素之一<sup>[4,6,7]</sup>. 资料表明, UGT1A1 基因突变类型存在人种和地域差异, 欧美多为 (TA) 7 基因突变<sup>[8,9]</sup>, Gly71Arg 突变在白种人和非洲人中尚未发现, 而亚洲多为 Gly71Arg 基因的突变<sup>[4,7,10]</sup>, TATA 启动子变异较为罕见. 本组

研究结果显示病例组 187 例患儿 UGT 1A1 基因 Gly71Arg 多态性的等位基因突变频率为 32%, 与东亚人群中 (日本、韩国和中国台湾人) 为 16%~26%、广西钟丹妮等<sup>[11]</sup> 报道为 34% 相一致, 证实昆明地区新生儿重症黄疸的发生和该基因多态性密切相关. 另外, 本研究还显示 UGT1A1 基因启动子 TATA 等位基因突变频率病例组 (9%) 与正常组 (7%) 无统计学差异, 表明昆明地区新生儿重症黄疸发生与该基因的突变无明显相关性. 而 UGT1A1 TATA 纯合子 A (TA) 7TAA (7/7) 的基因频率为 1%, 与有关资料所示亚洲人群中 UGT1A1 基因的多态性主要表现在编码区, 而罕见 TATA 启动子变异的报道<sup>[12]</sup> 相一致. 由此可见与该基因有关的新生儿重症黄疸可能存在人种、民族、地区之间的差异, 是环境和遗传因素共同作用的结果. 下一步将开展除昆明地区以外云南省其他不同地区不同民族新生儿重症黄疸 UGT1A1 基因多态性的大样本研究, 以了解云南省新生儿重症黄疸的遗传高危因素.

## [参考文献]

- [1] 诸福棠, 吴瑞萍, 胡亚美 主编. 实用儿科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 467.
- [2] RITTER J K, CRAWFORD J M, OWENS I S. Cloning of t-

(下转第 71 页)

- subtype of ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2000, 31(5): 1 069 – 1 075.
- [3] 蒋珍妮, 俞锋. 同型半胱氨酸与心血管疾病关系的研究进展[J]. *心脏杂志*, 2000, 12(3): 215 – 2184.
- [4] 马丽, 录海斌. 青年急性脑梗死与高同型半胱氨酸血症的相关性探讨[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2012, 1: 36 – 37.
- [5] WALD D S, LAWM, MORRIS J K. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis[J]. *BMJ*, 2002, 325(7): 1 202.
- [6] 薄涛. 高同型半胱氨酸血症与高血压及冠心病相关分析[J]. *慢性病医学杂志*, 2010, 12(5): 425 – 426.
- [7] BOUSHEY C J. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease [J]. *JAMA*, 1995, 274: 1 049 – 1 057.
- [8] BOYSEN G, BRANDERT, CHRISTENSEN H, et al. Homocysteine and risk of recurrent stroke [J]. *Stroke*, 2003, 34(5): 1 258 – 1 261.
- [9] SESHADRI S, BEISERA, SELHUB J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease [J]. *New Engl J Med*, 2002, 346: 476 – 483
- [10] BLANDINI F, FANCELLU R, MARTIGNONI E, et al. Plasma homocysteine and L-dopa metabolism in patients with Parkinson disease[J]. *Gin Chem*, 2001, 47: 1 102 – 1 110.
- [11] PETERWF. Homocysteine and coronary heart disease how great is the hazard[J]. *JAMA*, 2002, 288: 2 042 – 2 043.
- [12] 余海峰, 李春胜. 慢性肾功能衰竭对血浆同型半胱氨酸水平的影响[J]. *实用医学杂志*, 2005, 21(3): 275 – 276
- [13] 邓争荣, 杨贵琦, 陈新义. 同型半胱氨酸与高血压, 冠心病的相关性 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2002, 23(5): 468 – 469.
- (2012 – 09 – 14 收稿)

(上接第 54 页)

- wo human liver bilirubin UDP-glucuronosyltransferase cDNAs with expression in COS.1 cells [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 1 043 – 1 047.
- [3] BOSMA P J, CHOWDHURY N R, GOLDHOORN B G, et al. Sequence of exons and the flanking regions of human bilirubin.UDP-glucuronosyltransferase gene complex and identification of a genetic mutation in a patient with Crigler-Najjar syndrome, type I [J]. *Hepatology*, 1992, 15: 941 – 947.
- [4] AKABA K, KIMURA T, SASAKI A, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and mutation of the bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyl transferase gene: a common missense mutation among Japanese, Koreans and Chinese [J]. *Biochem Mol Biol Intl*, 1998, 46: 21 – 26.
- [5] COSTA E. Hematologically important mutations: Bilirubin UDP-glucuronosyl transferase gene mutations in Gilbert and Crigler – Najjar syndromes [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2006, 36(1): 77 – 80.
- [6] AKABA K, KIMURA T, SASAKI A, et al. Neonatal hyperbilirubinemia and a common mutation of the bilirubin uridine diphosphate glucuronosyl transferase gene in Japanese [J]. *J Hum Genet*, 1999, 44(1): 22 – 25.
- [7] MARUO Y, NISHIZAWA K, SATO H, et al. Association of neonatal hyperbilirubinemia with bilirubin UDP glucuronosyl transferase polymorphism [J]. *Pediatrics*, 1999, 103(6): 1 224 – 1 227.
- [8] BOSMA P J, GOLDHOORN B, OUDE ELFERINK R P, et al. A mutation in bilirubin uridine 5'-diphosphate glucuronosyl transferase iso form causing Crigler-Najjar type II [J]. *Gastroenterology*, 1993, 105: 216 – 220.
- [9] MONAGHAN G, MCLELLAN A, MCGEEHAN A, et al. Gilbert-syndrome is a contributory factor in prolonged unconjugated hyperbilirubinemia of the newborn [J]. *J Pediatr*, 1999, 134: 441 – 446.
- [10] AONO S, ADACHI Y, UYAMA E, et al. Analysis of genes for bilirubin UDP glucuronosyl transferase in Gilbert-syndrome [J]. *Lancet*, 1995, 345: 958 – 959.
- [11] 钟丹妮, 刘悠南. 广西新生儿胆红素·尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶基因 G ly71A 突变的研究 [J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(10): 579 – 581.
- [12] 孙革, 杜立中. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1 基因与新生儿黄疸 [J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(1): 71 – 73.
- (2012 – 08 – 21 收稿)